بررسی اثر زهر زنبور عسل بر آپوپتوز رده سلولی سرطانی لوکمی لنفوبلاستی حاد انسانی سلول T

محمد نبیونی [1*]، کاظم پریور [2]، عادله دیوسالار [1]، زهرا صفایی نژاد [3]

خلاصه:

سابقه و هدف: مطالعات اخیر تأثیر بالقوه زهر زنبور Bee Venom (BV) در درمان سرطان را اثبات می‌کنند. شواهد زیادی وجود دارند که تنظیم آپوپتوز فرآیند مهمی در ممانعت از پیشرفت تومور می‌باشد. باتوجه به اینکه مطالعات اخیر نشان می‌دهند BV دارای توانایی القاء آپوپتوز و در نتیجه سرکوب تومور می‌باشد، لذا هدف از انجام این مطالعه تعیین نوع مرگ سلولی القاء شده توسط BV در دودمان سرطانی MOLT-4 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا سلول‌های سرطانی MOLT-4 در محیط کشت RPMI-1640 درون پلیت کشت داده شدند. در ادامه، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف BV (۱، ۳، ٦ و ۸ µg/ml) در مدت زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت تیمار شدند. آنالیز مورفولوژی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس، درصد بقاء سلول‌ها توسط آزمون MTT و نوع مرگ سلولی القاء شده با BV توسط آزمون فلوسیتومتری بررسی شد.

نتایج: نتایج حاصل از آزمون بقاء سلولی نشان داد که میزان Cc_{50}، BV برای این رده سلولی در مدت زمان ۲٤ و ٤۸ ساعت به‌ترتیب ٦/۳ و ۰/٦ µg/ml می‌باشد. آنالیز مورفولوژیکی و نتایج حاصل از آنتی‌بادی Annexin V نیز نشان داد که مرگ القاء شده توسط BV از نوع آپوپتوز می‌باشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این مطالعه، BV قادر به القاء آپوپتوز در رده MOLT-4 است. لذا، این ترکیب می‌تواند نوید بخش طراحی داروهای جدید برای درمان سرطان در آینده‌ای نزدیک باشد.

واژگان کلیدی: زهر زنبور عسل، آپوپتوز، رده سلولی MOLT-4، لوکمی لنفوبلاستی حاد

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۱، صفحات ۱۲۷-۱۲۱

مقدمه

مطالعات گسترده‌ای در مورد مهار رشد سلول‌های توموری و متاستاز و هم‌چنین القاء آپوپتوز توسط مواد طبیعی گزارش شده است که نوید بخش درمان موثرتر انواع تومورهای انسانی می‌باشند [۵-۱]. BV ترکیبی است که به‌صورت سنتی برای تسکین درد و درمان بیماری‌های التهابی مزمن مانند آرتریت‌ها مورد استفاده بوده و تحقیقات متعددی که اخیرا صورت گرفته‌اند تأثیر بالقوه BV در درمان سرطان را اثبات می‌کنند [٦]. BV ترکیب بسیار پیچیده‌ای از پپتیدهای مختلف مانند ملیتین، آپامین، آدولاپین، آنزیم‌هایی از جمله هیالورونیداز و فسفولیپاز A_2، آمین-های فعال بیولوژیکی نظیر هیستامین و اپی‌نفرین و اجزاء غیرپپتیدی با خواص دارویی فراوان می‌باشد [۷].

ملیتین و فسفولیپاز A2 به‌عنوان دو جزء اصلی BV در نظر گرفته می‌شوند [۸]. ملیتین که ٦۰-۵۰ درصد زهر خشک را تشکیل می-دهد، به‌عنوان جزء اصلی سمی زهر شناخته می‌شود. هنگامی‌که مقداری از مولکول‌های ملیتین در غشاء سلول نفوذ کنند، فسفولیپیدها توسط آن شکسته شده و سلول لیز می‌گردد. در واقع این پلی‌پپتید منجر به از دست رفتن تمامیت دو لایه‌های فسفولیپیدی و سنتزی می‌شود. در کیسه زهر زنبور، ملیتین به-صورت ترامر می‌باشد، اما هنگام اثرگذاری بر روی سلول به-صورت مونومر عمل می‌نماید [۸]. گزارش شده است که این ماده قادر به القاء آپوپتوز بوده و اثرات ضد توموری دارد. انواع مختلفی از سلول‌های سرطانی مانند سلول‌های سرطانی کلیوی، کبدی، ریوی، پروستاتی، مثانه‌ای، کارسینومای پستانی و لوکمی می‌توانند توسط ملیتین به‌عنوان یکی از اجزاء فعال BV هدف-گیری شوند [۷]. فسفو لیپاز A_2 که ۲۰-۱۵ درصد BV را تشکیل می‌دهد، باعث فروپاشی ساختار فسفولیپیدهای غشاء سلولی و در نتیجه فروپاشی غشاء سلولی می‌گردد [۹]. شواهد زیادی دال بر این مطلب وجود دارند که آپوپتوز فرآیند مهمی در ممانعت از پیشرفت تومور بوده و نقش مهمی در درمان انواع تومورها بازی می‌کند [۱۰]. به‌بیان دیگر می‌توان گفت که یکی از بهترین

[1] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم

[2] استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم

[3] دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد تکوین جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم

* **نشانی نویسنده مسئول:**

تهران، دانشگاه تربیت معلم تهران، گروه زیست شناسی

تلفن: ۰۹۱۲ ۶۶۰۹۳۳۷ **دورنویس:** ۰۲۶۱ ۴۵۱۰۰۰۵

پست الکترونیک: Nabiuni@tmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۹ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۰/۶/۳۰

Archive of SID

www.SID.ir

استراتژی‌های به‌کار گرفته شده توسط ترکیبات ضد توموری، القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است [۱۱]. آپوپتوز یکی از اشکال مرگ برنامه‌ریزی شده می‌باشد که جنبه‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آن به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است. این نوع مرگ سلولی دارای عملکرد تکوینی و هومئوستاتیک می‌باشد. نقایصی در مسیر وقوع این نوع مرگ منجر به بروز مشکلات متعددی از جمله نامیرایی سلول و تومور زایی می‌گردد [۱۲]. سلول‌های آپوپتوزی با تغییرات مورفولوژیکی خاصی مانند متورم شدن غشا، چروکیدگی سیتوپلاسم و کاهش اندازه سلول (pyknosis)، متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن هسته (karyorrhexis) و در نهایت شکل‌گیری اجسام آپوپتوتیک که ویژگی غالب این نوع مرگ سلولی است شناخته می‌شوند. آپوپتوز بدون این که منجر به ایجاد واکنش‌های خود ایمنی و یا پاسخ‌های التهابی گردد، موجب هدف‌گیری سلول به سمت مرگ می‌گردد، زیرا سلول‌های آپوپتوتیک یک‌سری سیگنال‌هایی تحت عنوان eat-me signal از خود نشان می‌دهند که منجر به شناسایی و بلعیده شدن آنها توسط ماکروفاژها می‌گردد [۱۳]. از جمله این سیگنال‌ها می‌توان به جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین (PS) از سطح داخلی غشاء به سطح خارجی آن اشاره نمود [۱٤]. PS مولکولی است که به‌صورت طبیعی در نیمه داخلی غشاء پلاسمایی قرار دارد. در طی مراحل اولیه آپوپتوز زمانی که هنوز تغییرات مورفولوژیکی هسته مانند قطعه قطعه شدن DNA رخ نداده است و سلول به‌صورت دست نخورده است، این مولکول از نیمه داخلی غشاء سیتوپلاسمی به نیمه خارجی آن منتقل می‌شود [۱۵]. انکسین V (Annexin V) به‌عنوان یک پروتئین اندوژنوس ۳۲ کیلو-دالتونی قادر به اتصال به PS ظهور یافته در غشاء خارجی در یک الگوی وابسته به کلسیم می‌باشد؛ بنابراین می‌توان از انکسین V به-عنوان مارکر مناسبی برای شناسایی مراحل اولیه تا میانی آپوپتوز استفاده نمود [۱٦]. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که BV از طریق القاء آپوپتوز در مهار رشد سلول‌های سرطانی تأثیر گذار است. به-طور مثال نشان داده شده است که BV قادر به القاء آپوپتوز و مهار بیان سیکلو اکسیژناز ۲ (COX-2) در رده سلولی سرطان ریه انسانی NCI-H1299 است [۸]. Lee و همکارانش با بررسی اثرات BV بر روی سلول‌های لنفوسیتی سالم انسانی و رده سلولی سرطانی انسانی HL-60 نشان دادند که BV کامل دارای خصوصیات سیتوتوکسیک انتخابی بر روی سلول‌های نرمال و سرطانی است [۱۷]. BV از طریق افزایش بیان کاسپاز ۳ و مهار بیان ERK و Akt/Bcl-2 موجب القاء آپوپتوز در رده سلولی لوکمی میلوئیدی انسانی U937 نیز شده است [۱۸]. Tu و همکارانش گزارش کردند که BV در یک مسیر وابسته به کلسیم و غیر وابسته به کاسپاز موجب القاء مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در رده A2058 می‌گردد [۱۹]. هم‌چنین، نشان داده شده است که BV در یک مسیر وابسته به کاسپاز یا غیر وابسته به آن موجب القاء آپوپتوز در رده سلولی Ca Ski می‌گردد [۲۰]. Park و همکارانش اثبات نمودند که BV و ملیتین رشد رده‌های سلولی مرتبط با سرطان پروستات را از طریق القاء آپوپتوز مهار می‌کند [۲۱]. باتوجه به این یافته‌ها و با در نظر گرفتن این نکته که تاکنون هیچ‌گونه گزارشی در مورد تأثیر زهر زنبور بر روی لوکمی لنفوبلاستی حاد صورت نگرفته است، هدف از این پژوهش، تعیین دوز کشنده زهر زنبور و نوع مرگ سلولی القاء شده توسط زهر زنبور در رده سلولی MOLT-4 که یک رده سلولی مرتبط با این نوع سرطان است، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول: پس از تهیه رده سلولی MOLT-4 (به-شماره C149) از انستیتو پاستور تهران، سلول‌ها در محیط کشت PMI-1640 (SIGMA) غنی شده با ۱۰ درصد (Gibco) FBS (Fetal Bovine Serum) و ۱۰۰Unit/ml آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml آنتی بیوتیک استرپتومایسین (Gibco) به تعداد ۸×۱۰^{٤} درون پلیت ۲٤ خانه‌ای کشت داده شده و درون انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. پس از گذشت ۱ ساعت، یک گروه از سلول‌ها به‌عنوان گروه کنترل هیچ‌یک از غلظت‌های BV را دریافت نکرد و سایر گروه‌ها تحت تأثیر غلظت‌های ۱، ۳، ٦ و ۸ µg/ml از زهر زنبور (تهیه شده با استفاده از روش شوک الکتریکی با به‌کارگیری ولتاژ ۲۰ ولت بر روی صفحه شیشه‌ای) قرار گرفتند.

آزمون MTT جهت ارزیابی بقاء سلولی: برای‌بررسی تأثیر BV بر میزان بقاء سلولی از روش رنگ سنجی که به اختصار MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) نامیده می‌شود، استفاده شد. این روش بر پایه توانایی تبدیل محلول MTT به بلورهای فورومازان نامحلول توسط سلول‌های زنده استوار است. به‌منظور انجام این تست سلول‌ها به تعداد مذکور در هر چاهک پلیت ۲٤ خانه‌ای کشت داده شدند. در ادامه سلول‌ها با غلظت‌های مختلف زهر زنبور (۱، ۳، ٦ و ۸ µg/ml) به‌مدت ۲٤ و ٤۸ ساعت تیمار شدند. پس از طی زمان‌های مورد نظر به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه کرده و سلول‌ها به مدت ٤-۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از گذشت این مدت زمان، به هر چاهک ۱ میلی لیتر

Archive of SID

www.SID.ir

ایزوپروپانول اسیدی اضافه گردید و نمونه‌ها به‌مدت ۱۰-۸ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شده و سپس دانسیته نوری محلول درون هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر سنجیده شد و درصد بقاء سلول‌های زنده از فرمول زیر محاسبه گردید.

Viability percentage=Optical density test/optical density control×100

ارزیابی مورفولوژی سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس: پس از کشت سلول‌های MOLT-4 و تیمار نمودن آنها با غلظت‌های مورد نظر BV و پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت، سلول‌ها از نظر مورفولوژیکی به دقت با میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند.

ارزیابی آپوپتوز با استفاده از آزمون فلوسیتومتری: همان‌گونه که شرح آن گذشت انکسین-V، پروتئینی است که در یک رفتار وابسته به کلسیم به PS موجود در غشاء پلاسمایی متصل می‌شود. سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپوپتوز می‌باشند PS را از نیمه درونی غشاء پلاسمایی به نیمه خارجی آن می‌فرستند و به‌عنوان علامتی برای سلول‌های فاگوسیتوز کننده تلقی خواهد شد تا پیش از آن که تمامیت غشاء این سلول‌ها از بین برود و مواد التهابی از آنها بیرون بریزد، توسط سلول‌های فاگوسیتوز کننده حذف شوند. بر این اساس سلول‌هایی که در مرحله آغازی آپوپتوز هستند از لحاظ بر همکنش با انکسین FITC- V، که FITC متصل به آن فلورسانس سبز رنگ ایجاد می‌کند مثبت می‌باشند. به‌منظور مهیا سازی سلول‌ها جهت بررسی مرگ آپوپتوتیک ناشی از تیمار با BV در غلظت‌های Cc_{50} (غلظتی از BV که ایجاد ۵۰ درصد سمیت یا مرگ و میر در سلول‌ها می‌نماید) و $2Cc_{50}$ با روش فلوسیتومتری مراحل زیر انجام شد: ۱- سلول‌ها به تعداد ۲×۱۰^{۶} در هر یک از چاهک‌های پلیت ۶ خانه کشت شدند؛ ۲- پس از پایان زمان انکوباسیون سلولی (۲۴ ساعت در غیاب و در حضور غلظت‌های ذکر شده از BV) هر یک از نمونه‌ها به‌منظور جمع-آوری سلول‌ها، در ۲۲۰۰ rpm به‌مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند، پس از سانتریفوژ، محیط رویی دور ریخته شد؛ ۳- با هدف انجام شست و شو، به پلت‌های سلولی PBS اضافه نموده و پس از پیپتاژ نمودن، در ۲۲۰۰ rpm به‌مدت ۱۲ دقیقه سانتریفوژ شدند، پس از سانتریفیوژ، محیط رویی دور ریخته شد؛ ۴- به هریک از پلت‌های سلولی ۱۰۰µl آنتی‌بادی انکسین V رقیق شده با بافر بلوکه کننده (BSA-PBS ۳ درصد) اضافه شد و به مدت ۵ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند؛ ۵- پس از طی زمان انکوباسیون، حجم سلول‌ها با PBS به ۱۰۰۰µl رسانیده و در rpm ۲۲۰۰ سانتریفیوژکرده، پس از سانتریفیوژ، محیط رویی دور ریخته شد؛ ۶- در این مرحله ۲۰ µl از آنتی‌بادی ثانویه (anti-rabbit IgG) کونژوگه با رنگ فلورسنت FITC رقیق شده با بافر بلوکه کننده به سلول‌ها افزوده و نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در تاریکی درون یخچال قرار داده شدند؛ ۷- سپس در این مرحله حجم محلول‌ها را با PBS به ۱۰۰۰µl رسانده به مدت ۱۲ دقیقه در rpm ۲۲۰۰ سانتریفیوژ شدند و ۸- در پایان، به هریک از نمونه‌ها ۳۰۰µl فرمالین ۱ درصد اضافه کرده و با دستگاه فلوسیتومتری آنالیز گردیدند.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط آزمون One-way ANOVA و با استفاده از نرم افزار InStat-3 انجام شد $P<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی گردید و هر آزمایش حداقل ۳ مرتبه تکرار شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی تأثیرBV بر میزان بقاء سلولی رده سلولی MOLT-4 با روش MTT نشان داد که BV در یک الگوی وابسته به دوز و زمان منجر به القاء مرگ سلولی در این رده می‌گردد. همان‌طور که در شکل شماره ۱ نیز نشان داده شده است درصد بقاء سلول‌های تحت تیمار با BV در غلظت‌های ۱ و ۳ و ۶ و ۸ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از محیط کشت در مدت زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه کنترل به‌ترتیب ۸۷/۵ درصد ($P=۰/۰۵$)، ۸۱/۵ درصد ($P=۰/۰۱$)، ۵۴ درصد ($P=۰/۰۰۱$) و ۴۴/۵ درصد ($P=۰/۰۰۱$) و در غلظت‌های ۱، ۳ و ۶ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از محیط کشت در مدت زمان ۴۸ ساعت نسبت به گروه کنترل به-ترتیب ۳۸ ، ۲۸ و ۲۵/۶ درصد (همگی با $P=۰/۰۰۱$) بود و غلظتی از این ترکیب که منجر به القاء پنجاه درصد مرگ سلولی پس از طی ۲۴ و ۴۸ ساعت گردید به‌ترتیب ۶/۳ و ۰/۶ µg/ ml بود.

آنالیز مورفولوژیک سلول‌ها قبل و بعد از تیمار با زهر زنبور

به‌منظور بررسی مورفولوژی سلولی، سلول‌ها قبل و بعد از تیمار با BV به‌دقت توسط میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند. شکل شماره ۲ نشان می‌دهد که سلول‌ها قبل از تیمار با BV به‌صورت سالم و یکپارچه با هسته کاملا طبیعی دیده می-شدند، در صورتی‌که پس از تیمار با این ترکیب بسته به میزان دوز دریافتی درجات مختلفی از متراکم شدن هسته مشاهده گردید.

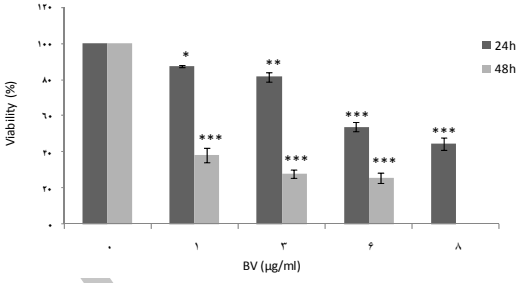
ارزیابی آپوپتوز به‌روش فلوسیتومتری

پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های Cc_{50} و Cc_{50} ۲ زهر

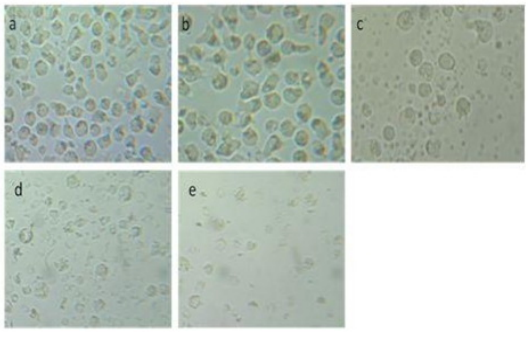
Archive of SID

www.SID.ir

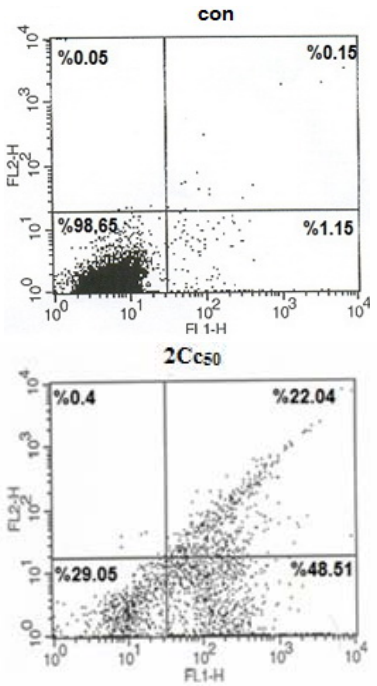
زنبور، سلول‌های تیمار شده و سلول‌های تیمارنشده، با آنتی بادی اولیه annexinV و آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار به رنگ فلورسنت انکوبه شدند. نتایج حاصل از این بررسی در جدول شماره ۱ و شکل شماره ۳ نشان داده شده است. در این شکل، سلول‌های زنده در سمت چپ و پایین، سلول‌های در مرحله اولیه آپوپتوز در سمت راست پایین، سلول‌های در مرحله انتهایی آپوپتوز در سمت راست بالا و سلول‌های نکروزه در سمت چپ بالای منحنی دیده می‌شوند. داده‌های منحنی فلوسیتومتری نشان داد که پس از طی ۲٤ ساعت دوز Cc_{50} زهر زنبور تأثیر چندانی بر القاء مرگ آپوپتوتیک نداشته و دوز Cc_{50} ۲ زهر زنبور موجب القاء بخش اعظم مرگ آپوپتوزی در سلول‌های MOLT-4 گشته است.



شکل شماره ۱- مقایسه اثرغلظت‌های مختلف زهر زنبور عسل بر درصد بقاء سلول‌های MOLT-4 پس از طی ۲٤ و ٤۸ ساعت از تیمار بر اساس سنجش MTT. درصد بقاء سلول‌های تحت تیمار با BV در غلظت‌های ۱ و ۳ و ٦ و ۸ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از محیط کشت در مدت زمان ۲٤ ساعت نسبت به گروه کنترل به‌ترتیب ۸۷/۵، ۸۱/۵، ٥٤ و ٤٤/۵ درصد و در غلظت‌های ۱، ۳، و ٦ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از محیط کشت در مدت زمان ٤۸ ساعت نسبت به گروه کنترل به‌ترتیب ۳۸، ۲۸ و ۲۵/٦ درصد بود. (P=۰/۰٥*، P=۰/۰۱** ، P=۰/۰۰۱*** Mean±S.E)



شکل شماره ۲- فتومیکروگراف از تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های MOLT-4 نسبت به گروه کنترل که تحت تأثیر غلظت‌های مختلف زهر زنبور در مدت زمان ۲٤ ساعت قرار گرفته‌اند. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود با افزایش دوز زهر زنبور، سیتوپلاسم و هسته سلول‌ها حالت طبیعی خود را از دست داده‌اند و تعداد سلول‌ها به‌صورت چشم‌گیری کاهش یافته است. بزرگ‌نمایی×٤۰۰. گروه a: کنترل؛ گروه b: تیمار با دوز ۱µg/ml؛ گروهc: تیمار با دوز ۳µg/ml؛ گروه d: تیمار با دوز ٦µg/ml و گروهe: تیمار با دوز ۸µg/ml



شکل شماره ۳- نتایج حاصل از آنالیز فلوسیتومتری اثر زهر زنبور عسل بر روی سلول‌های MOLT-4 پس از گذشت ۲٤ ساعت از تیمار. نتایج به‌دست آمده از این آزمون نشان می‌دهند که پس از طی ۲٤ ساعت دوز Cc_{50} زهر زنبور تأثیر چندانی بر القاء مرگ آپوپتوتیک نداشته، اما دوز Cc_{50} ۲ از زهر زنبور موجب القاء بخش مرگ سلولی آپوپتوزی در سلول‌های این رده گشته است. در منحنی، جمعیت سلول‌های زنده در سمت چپ پایین (LL)، سلول‌های در مراحل اولیه آپوپتوز در سمت راست پایین (LR) و سلول‌های در مراحل انتهایی آپوپتوز در سمت راست بالا (UR) قرار دارند.

جدول شماره ۱- نتایج حاصل از آزمون فلوسیتومتری اثر زهر زنبور عسل بر روی سلول‌های MOLT-4 در نمونه کنترل و نمونه تیمار شده با دوز Cc_{50} ۲ از زهر زنبورعسل.

Cells	UR	LL	LR
Control (No Bee Venom)	0.15%	0.98.68	1.15%
Bee Venom (2CC50)	22.04%	29.05%	48.51%

بحث

زهر زنبور عسل مانند سایر داروهای مکمل طی قرن‌های متمادی در درمان بیماری‌های مختلفی مانند آرتریت، مولتیپل اسکلروزیس، ترمیم زخم‌ها، نقرس، سوختگی‌ها و تسکین درد کاربرد داشته است. اخیرا نیز این ماده به‌عنوان ترکیب موثری برای درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات متعدد نشان می‌دهند زهر زنبور قادر به القاء آپوپتوز در رده‌های سلولی

Archive of SID

www.SID.ir

سرطانی است [٦]. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمار سلول-های MOLT-4 با غلظت‌های بسیار پایین از BV موجب مهار تکثیر و القاء مرگ سلولی در یک الگوی وابسته به دوز و زمان می‌گردد؛ به‌طوری‌که غلظت ٦/٣ µg/ml از این ترکیب پس از طی ٢٤ ساعت و غلظت ٠/٦ µg/ml پس از طی ٤٨ ساعت موجب القاء پنجاه در صد مرگ سلولی در این رده شد. در واقع به‌علت این‌که غلظت‌های بسیار زیاد BV موجب رسوب این ترکیب در محیط می‌گشتند و در نتیجه داده های به‌دست آمده در تکرارهای متفاوت قابل انطباق نبودند تنها از غلظت‌های پایین BV (غلظت‌های کم‌تر از ١٠µg/ml) استفاده گردید. این امر، دلیل حذف نمونه تیمار شده با دوز ٨ µg/ml از BV پس از طی ٤٨ ساعت، از نتایج آزمون MTT نیز می‌باشد. بررسی مورفولوژیکی سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس یک ویژگی اصلی سلول آپوپتوزی یعنی هسته متراکم شده را نشان داد و آنالیز فلوسیتومتری نیز اثبات نمود که مرگ سلولی القاء شده با زهر زنبور از نوع آپوپتوز می‌باشد. در توافق با نتایج حاصل، Jang و همکارانش گزارش کردند که BV قادر به القاء آپوپتوز و مهار بیان سیکلواکسیژناز (COX-2) در رده سلولی سرطان ریه انسانی NCI-H1299 می‌باشد. آنها نشان دادند که غلظت مشخصی از BV قادر به قطعه قطعه کردن DNA به‌دنبال فعال شدن اندونوکلئازها، القاء تغییرات مورفولوژیکی مرتبط با آپوپتوز مانند تشکیل اجسام آپوپتوتیک، افزایش بیان Bax و کاسپاز ٣ و کاهش بیان Bcl-2، مهار انتخابی بیان COX-2 و کاهش تولید پروستاگلاندین‌ها (PG_S) می‌باشد [٨]. Lee و همکارانش اثرات BV را بر روی سلول‌های لنفوسیتی سالم انسانی و رده سلولی سرطانی انسانی HL-60 مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردند BV کامل دارای خصوصیات سیتوتوکسیک انتخابی بر روی سلول‌های نرمال و سرطانی است. به‌کارگیری این ماده در یک الگوی وابسته به دوز تا ٢٤ ساعت موجب کاهش بقاء سلول‌های HL-60 می‌شود. آنها نشان دادند که فسفو لیپاز A2 موجود در BV باعث از بین رفتن تمامیت غشاء سلول‌های HL-60 می‌شود؛ درحالی‌که در سلول‌های لنفوسیتی نرمال انسانی BV موجب القاء تغییرات مورفولوژیکی که تاحدودی شبیه به آپوپتوز می‌باشند، می‌شود اما در واقع نمی‌توان از آن به‌عنوان مرگ سلولی آپوپتوتیک کامل یاد نمود [١٧]. اثر BV بر رده سلولی لوکمیایی انسانی U937 نیز نشان داد که BV القاء کننده آپوپتوز از طریق افزایش بیان کاسپاز٣ و مهار بیان Bcl-2، Akt/ERK و افزایش سطح FAS/FASL و کاهش سطح HTert و Cox-2 در این رده است [١٨]. Tu و همکارانش اثرات BV را بر روی رده سلولی A2058 که یک رده سلولی مربوط به ملانومای انسانی است را مورد بررسی قرار دادند. این گروه تحقیقاتی اذعان نمودند که BV در یک مسیر وابسته به کلسیم و غیر وابسته به کاسپاز موجب القاء مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در این رده می‌گردد؛ درصورتی‌که چنین اثری را بر روی سلول‌های فیبروبلاستی نرمال Detroit 551 ندارد [١٩]. در یک مطالعه‌ی دیگر اثر BV بر رده سلولی Ca Ski مربوط به کارسینومای سرویکس انسان بررسی شد. BV از طریق کاهش بیان Bcl-2 و افزایش بیان Bax،p21، p53 و Fas، اختلال در عملکرد میتوکندری (کاهش پتانسیل غشایی آن) و در نتیجه آزاد شدن سیتوکروم c از میتوکندری، تولید ROS و کلسیم و فعال شدن کاسپازهای آغازی ٨ و ٩ و متعاقب آنها کاسپاز عمل‌کننده ٣ منجر به قطعه قطعه شدن DNA می‌شود. بر این اساس آپوپتوز القاء شده با BV وابسته به کاسپاز و میتوکندری می‌باشد و از طرف دیگر BV با القاء بیان آپوپتوز هستند، می‌توانند در درمان سرطان مفید باشند؛ لذا، BV می‌تواند گزینه مناسبی برای درمان انواع مختلف سرطان‌ها از جمله لوکمی لنفوبلاستی حاد سلول T باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی- تکوینی گروه زیست شناسی دانشگاه تربیت معلم پردیس کرج انجام گرفته است. از مدیریت محترم گروه زیست شناسی و ریاست محترم دانشکده علوم که امکانات اجرایی این طرح تحقیقاتی را فراهم نمودند، از جناب آقای دکتر ایمانی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات جهت تأمین زهر زنبور عسل و مرکز سلولی-مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت همکاری‌های لازم در زمینه انجام آزمون فلوسیتومتری صمیمانه سپاسگزاریم.

References:

[1] Orsolic N, Sver L, Verstovsek S, Terzic S, Basic I. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. ***Toxicon*** 2003; 41(7): 861-70.

[2] Orsolic N, Sacases F, Basic I. Antimetastatic ability of honey bee products. ***Period Biol*** 2007; 109: 173-80.

[3] Liu S, Yu M, He Y, Xiao L, Wang F, Song C, et al. Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway. ***Hepatology*** 2008; 47(6): 1964-73.

Archive of SID

www.SID.ir

[4] Liu X, Chen D, Xie L, Zhang R. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. ***J Pharm Pharmacol*** 2002; 54(8): 1083-9.
[5] Yusuf N, Irby C, Katiyar SK, Elmets CA. Photoprotective effects of green tea polyphenols. ***Photodermatol Photoimmunol Photomed*** 2007; 23(1): 48-56.
[6] Chen J, Lariviere WR. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. ***Prog Neurobiol*** 2010; 92(2): 151–83.
[7] Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. ***Pharmacol Ther*** 2007; 115(2): 246-70.
[8] Jang MH, Shin MC, Lim S, Han SM, Park HJ, Shin I, et al. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. ***J Pharmacol Sci*** 2003; 91(2): 95-104.
[9] Chu ST, Cheng HH, Huang CJ, Chang HC, Chi CC, Su HH, et al. Phospholipase A_2-independent Ca^{2+} entry and subsequent apoptosis induced by melittin in human MG63 osteosarcoma cells. ***Life Sci*** 2007; 80(4): 364–9.
[10] Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. ***Cancer*** 1994; 73(8): 2013–26.
[11] Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. ***Int Rev Exp Pathol*** 1991; 32: 223-25.
[12] Blank M, Shiloh Y. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. ***Cell Cycle*** 2007; 6(6): 686-95.
[13] Giansanti V, Ivana Scovassi A. Cell death: A one-way journey to the graveyard. ***Open Biol J*** 2008; 1: 27-34.
[14] Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. ***J Leukoc Biol*** 2006; 79(5): 896-903.
[15] Peker C, Sarda-Mantel L, Loiseau P, Rouzet F, Nazneen L, Martet G, et al. Imaging apoptosis with 99mTc-Annexin-V in experimental subacute myocarditis. ***J Nucl Med*** 2004; 45(6): 1081-6.
[16] Ohtsuki K, Akashi K, Aoka Y, Blankenberg FG, Kopiwoda S, Tait JF, et al. Technetium-99m hynic-annexin V: a potential radiopharmaceutical for the in-vivo detection of apoptosis. ***Eur J Nucl Med*** 1999; 26(10): 1251–8.
[17] Lee YJ, Kang SJ, Kim BM, Kim YJ, Woo HD, Chung HW. Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. ***Chem Biol Interact*** 2007; 169(3): 189-97.
[18] Moon DO, Park SY, Heo MS, Kim KC, Park C, Ko WS, et al. Key regulators in bee venom–induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through down regulation of ERK and AKT. ***Int Immunopharmacol*** 2006; 6(12): 1796-807.
[19] Tu WC, Wu CC, Hsieh HL, Chen CY, Hsu SL. Honey bee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. ***Toxicon*** 2008; 52(2): 318–29.
[20] Ip SW, Wei HC, Lin JP, Kuo HM, Liu KC, Hsu SC, et al. Bee venom induced cell cycle arrest and apoptosis in human cervical epidermoid carcinoma Ca Ski cells. ***Anticancer Res*** 2008; 28 (2A): 833-42.
[21] Park MH, Choi MS, Kwak DH, Oh KW, Yoon DY, Han SB, et al. Anti cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF-kB. ***Prostate*** 2010. [Epub ahead of print]

Archive of SID

www.SID.ir